

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-033332

(43)Date of publication of application : 13.02.1988

(51)Int.Cl.

A61K 31/70
C07H 15/256

(21)Application number : 61-174724

(71)Applicant : MINOFUAGEN SEYAKU
HONPO:GOUSHI

(22)Date of filing : 26.07.1986

(72)Inventor : ITO MASAHIKO
NAKAJIMA HIDEKI
BABA MASANORI
SHIGETA SHIRO
YAMAMOTO NAOKI

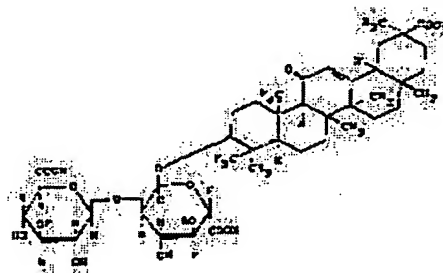
(54) AGENT FOR SUPPRESSING GROWTH OF AIDS VIRUS

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide an agent for suppressing growth of AIDS virus by using glycyrrhizin which is an active component of licorice, as an active component.

CONSTITUTION: Glycyrrhizin of formula or its salt is compounded with an excipient (e.g. potato starch, sodium alginate, etc.) and formed to the form of powder, granule, sugar-coated tablet, capsule, etc. It can be administered orally or parenterally at a dose of 200W400 mg daily for oral administration and 120W200 mg daily for parenteral administration for adult. An injection can be prepared by adding distilled water for injection, physiological saline water, detoxication aminoacetic acid, etc., to a solvent. The

salt of glycyrrhizin is produced by reacting glycyrrhizin with an inorganic or organic base at equimolar ratio. Glycyrrhizin strongly suppresses the growth of AIDS virus HTLV-III/LAV, exhibits mutation-suppressing action to infected cell and is free from inhibition to reverse transcriptase which is common in conventional remedy for AIDS.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-33332

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)2月13日

A 61 K 31/70
C 07 H 15/256

ADY

7138-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 エイズ・ウイルス増殖抑制剤

⑯ 特 願 昭61-174724

⑰ 出 願 昭61(1986)7月26日

⑱ 発 明 者	伊 藤	正 彦	福島県福島市渡利字七社宮74-1
⑱ 発 明 者	中 島	秀 喜	山口県宇部市大字小串924-6
⑱ 発 明 者	馬 場	昌 範	福島県福島市野田町2-3-47 福島医大アパート8号
⑱ 発 明 者	茂 田	士 郎	福島県福島市大森字久保内147-28
⑱ 発 明 者	山 本	直 樹	山口県宇部市東小羽山町1-7-12
⑲ 出 願 人	合資会社	ミノファ	東京都新宿区四谷3丁目2番地7
	ゲン製薬本舗		
⑳ 代 理 人	弁理士	永 田 秀 男	

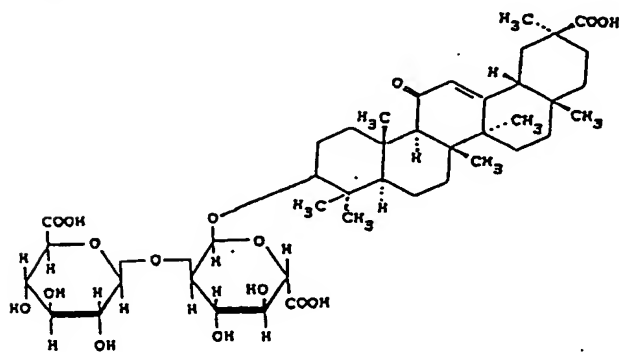
明 細 書

1. 発明の名称

エイズ・ウイルス増殖抑制剤

2. 特許請求の範囲

式:



で示されるグリチルリチン、及びその製剤上許容される塩を有効成分として含有するエイズ・ウイルス増殖抑制剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、甘草有効成分であるグリチルリチンを有効成分として含有するエイズ・ウイルス増殖抑制剤に関するものである。

(従来技術及び問題点)

後天性免疫不全症候群(AIDS、エイズ)は1982年米国で発見された疾患で、その原因はウイルスによるので、発見者等により夫々Lymphadenopathy associated virus(LAV)又はHuman Tlymphotropic retrovirus typeⅢ(HTLV-Ⅲ)と命名され一般的に両者合わせてHTLV-Ⅲ/LAVと表現される。これはヒトレトロウイルスに属し、このウイルスによりリンパ球のヘルパーⅠ細胞が破壊され、その結果、細胞性免疫不全となり、原虫、真菌、ウイルス、細菌などによる日和見感染、カボシ肉腫などが発生する死亡率の高い重篤な疾患である。米国では、数年後には死者五万人余に達すると予測されている現状である。

このHTLV-Ⅲ/LAVはAIDS患者の血液及び精液や

唾液中に存在し、輸血その他の原因によって感染する。この疾患に対する治療剤は従来からいくつか報告されている。それらの多くはHTLV-Ⅲ/LAV中に含まれているレトロウィルスの複製に重要な役割をもつ逆転写酵素活性を抑制する作用をもつものであって、例えば3'-アジド-デオキシチミジン、或いはHPA-23などがある。これらに加えてインターロイキンⅡ、インターフェロン及びイソプリノシン等が患者の免疫欠損に対しての免疫促進剤として使用されている。

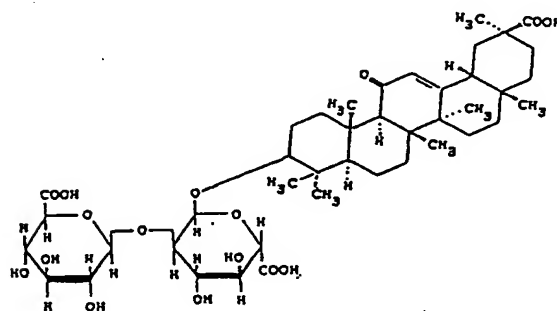
しかし現状では、エイズ患者に対するさらに多くの有用な治療薬の緊急的開発が急務となっている。

本発明者等は、近年、甘草の有効成分の一つであるグリチルリチンが、*in vitro*において数種のDNA、RNAウィルスに対して抗ウィルス活性を奏することが報告されていることに注目し(Pompei R. et al: Nature 281, p. 689-690, 1979)、本化合物がAIDSの原因ウィルスであるHTLV-Ⅲ/LAVの増殖抑制効果を現わすか否かをHTLV-Ⅲ/LAV-MT-4細胞

を用いて種々検討した。その結果、グリチルリチンがHTLV-Ⅲ/LAVの増殖を有効に抑制する作用があることを発見し、本発明を完成するに至ったものである。

(発明の構成)

本発明に係るエイズ・ウィルス増殖抑制剤は、次式で表わされるグリチルリチンを有効成分とする。



本グリチルリチンは顕著なエイズ・ウィルス増殖抑制作用を示すものであり、そのままエイズ・ウィルス増殖抑制剤とするか、またはその製剤上許容される塩、即ちグリチルリチンと無機、有機

の塩基とをモル比で作用させて得られるグリチルリチンアンモニウム塩、グリチルリチンアルカリ金属塩、或いはグリチルリチンコリン塩等のグリチルリチン塩を有効成分とする形でエイズ患者に投与することが可能である。投与する方法としては、経口或いは非経口のいずれをも選択でき、また投与量は患者の年齢、症状等により異なるが、一般には経口投与では成人一日当り200~400 mgの範囲で用いることにより所期の効果が期待できる。

剤形は、製剤上許容される無害の一種、或いは数種の賦形剤、例えば乳糖、バレイショデンプン、アルギン酸ナトリウム、アミノ酢酸、メチオニン、炭酸カルシウム等を配剤した散剤、顆粒剤、糖衣錠、及びカプセル剤等とすることができる。

非経口の場合の投与量は、成人一日当り120~200 mgの範囲で用いられ注射剤の場合、溶媒は単に注射用蒸留水または生理食塩液のみか、或いは解糖アミノ酢酸等のアミノ酸等を添加してもよ

い。

なお、最近グリチルリチン製剤は慢性ウィルス肝炎の予防、治療剤としても優れた効果をあげているが、その大量投与によっても何等副作用がみられない(鈴木等: 医学のあゆみ, 102 p. 526-578, 1977)。

次に本願のエイズ・ウィルス増殖抑制剤について製剤例を掲げる。

[製剤例1]

錠剤の製造

グリチルリチン	25 mg
バレイショデンプン	220 mg
ステアリン酸マグネシウム	5 mg
合 計	250 mg

上記組成の混合物を常法により錠剤とする。

〔製剤例2〕

糖衣錠の製造

グリチルリチン	25 mg
グリシン	25 mg
メチオニン	25 mg
炭酸カルシウム、	適量
乳糖、	適量
カルボオキシメチルセルローズ	適量
合 計	300 mg

上記組成の混合物を常法により糖衣錠とする。

〔製剤例3〕

注射剤の製造

グリチルリチン200 mgを生理食塩水液に溶解し、100 mlとする。

〔製剤例4〕

注射剤の製造

グリチルリチン200 mg、グリシン2000 mg システイン100 mgを生理食塩水液に溶解し、100 ml

とする。

以下にグリチルリチンのエイズ・ウイルス増殖抑制作用についての実験例を掲げるが、これらの実験により甘草有効成分であるグリチルリチンがエイズ・ウイルスHTLV-Ⅲ/LAVの増殖を強く抑制し、かつ感染細胞の変性抑制効果のあることが明らかになった。しかし、従来のエイズ治療薬にみられるような逆転酵素阻害作用はみられなかった。グリチルリチンの場合には、ある特殊な作用機序が参与しているためと考えられる。

また、従来はHTLV-Ⅲ/LAVウイルスに関しては適当な定量法がなかったが、最近HTLV-Iキャリアー細胞系に属するMT-4細胞を用いてHTLV-Ⅲ/LAVウイルスブランク形成定量法(Harada et al: Science, 229, p.563-566 1985)が確立されたのでそれに準拠して実験を行なった。

次いで感染細胞の変性抑制、及びその薬効のメカニズムを検討すべく、逆転酵素活性の測定、ウイルス中和作用等の諸実験も行なった。

〔実験例〕

(材料)

(1) 細胞とウイルス

感染細胞はHTLV-I陽性細胞であるMT-4細胞を用いた。ウイルスはMOL1-4/HTLV-Ⅲ産生株より得たものを使用した。

(2) グリチルリチン水溶液の調整

a) 純グリチルリチン(合資会社ミノファージェン製薬本館製)2 gを水90 mlに攪拌しつつ懸濁させ、微温にてアンモニア試薬、または水酸化ナトリウム試薬、または水酸化カリウム試薬を少量添加して溶解し、pH 6.5~7.0とした後、室温にて水を加え100 mlとする。

b) グリチルリチンアンモニウム塩の場合

グリチルリチンモノアンモニウム塩2.04 gをとり水90 mlを加え微温にて溶解し、アンモニア試薬を加えpH 6.5~7.0とし、室温にて水を加え100 mlとする。

c) グリチルリチンモノナトリウム塩の場合

グリチルリチンモノナトリウム塩2.05 gをとり

水90 mlを加え微温にて溶解し、水酸化ナトリウム試薬にてpH 6.5~7.0とし、室温にて水を加え100 mlとする。

d) グリチルリチンモノカリウム塩の場合

グリチルリチンモノカリウム塩2.09 gをとり水酸化カリウム試薬にて上記と同様に調整する。

上記の調整法によって2%グリチルリチン水溶液(1ml中にグリチルリチン20 mg含有)が得られる。使用時に0.01Mのリン酸緩衝液にて必要な濃度に希釈し、pH 7.2に調整する。

〔実験法〕

(1) Plaque reduction法

(HTLV-Ⅲ/LAVのブランク形成抑制実験)

MT-4細胞 150×10^4 個/mlをPolylysine(シグマ社製)を用い、 35×10 mmのシャーレに付着させ、2回培養液で洗い、100PFU/100 μ lのHTLV-Ⅲ/LAVを100 μ l加え、4℃で1時間培養する。その後種々の濃度のグリチルリチン水溶液を加え、抗生物質、10%胎児ウシ血清及び0.6アガロースを含むRPMI1640を1 ml添加し37℃、5%

CO₂で3日間培養する。その後neutral redを含む上記培養地を1 ml 加え、さらに3日間培養して、出現したブラック数を数えた。結果を第1図に示す。グリチルリチンには明らかにウイルス増殖抑制の効果がみられる。即ち、グリチルリチンは0.5~1 mg の用量にて完全に増殖を抑制した。その50%抑制濃度は平均0.125 mg/ml であった。このID50の値0.125 mg/ml はヒト胚の線維芽細胞の水痘ヘルペスウイルスの0.58 mg/ml、或いは単純ヘルペスウイルスの0.60 mg/ml に比較して低い値であった。

(2) 感染細胞の変性抑制法

(HTLV-ⅢのMT-4細胞に対する変性抑制効果の実験)

3×10⁴個のMT-4細胞に6×10⁴PFUのHTLV-Ⅲを感染させ、種々の濃度のグリチルリチン水溶液を加え、3日間抗生物質、10%胎児ウシ血清を含むRPMI1640培養液で培養し、その後トリパンブルー排除法で生細胞数を計測した。対照として非感染細胞にも同様の実験を行なった。

による)。グリチルリチンはHTLV-Ⅲの逆転写酵素活性を抑制しなかった。

(5) ウィルス中和作用の検討

ウィルスと種々の濃度のグリチルリチン水溶液を混合し、37℃で1時間インキュベートした後、これを200、400倍に希釈しMT-4細胞に接種しウィルス力価の変化をみた。グリチルリチンはHTLV-Ⅲに対して2 mg/ml の濃度でも中和作用はみられなかった。

(グリチルリチンの急性毒性試験)

グリチルリチンについてのLD50は以下の通りであり低毒性である。

- | | |
|------------------|---------------|
| (1) 経口投与 | 3 g/kg < |
| (ラット) | |
| (2) 皮下注射 5%水溶液 | 1873.3 mg/kg |
| (マウス) | |
| (3) 静脈注射 2%水溶液 | 682.5 mg/kg |
| (マウス) | |
| (4) 腹腔注射 0.2%水溶液 | 225-244 ml/kg |
| (マウス) | |

本実験はアガロースなしの培養条件で、グリチルリチンのMT-4細胞に対してのHTLV-Ⅲの感染細胞変性の抑制効果についてのものであるが、その結果を第2図に示す。

トリパンブルー排除法により3日間の培養においてグリチルリチン0.25、0.5、1 mg/ml の用量で抑制がみられた。一方、非感染MT-4細胞に対するグリチルリチンの細胞変性効果は、そのID50が2 mg/ml であったが、この濃度においては細胞の死滅がみられなかった。

(3) ウィルス抗原の検出

感染細胞に抗HTLV-Ⅲ抗体陽性血清を使用し間接蛍光抗体法を行なった。グリチルリチン0.5~1 mg/ml でHTLV-Ⅲ抗原陽性細胞の出現を2%以下に抑制したが、これより低い濃度では次第に陽性細胞の割合が増加した。

(4) 逆転写酵素活性の測定

超遠心にてウィルスを濃縮し、種々の濃度のグリチルリチン水溶液を加え、酵素活性を測定した(Harada et al: -Virology 146, p.272-281 1985

4. 図面の簡単な説明

第1図は、グリチルリチンについてのHTLV-Ⅲ/LAVのブラック形成抑制実験の結果を示す図、第2図は、そのHTLV-ⅢのMT-4細胞に対する変性抑制効果の実験の結果を示す図である。

出願人 合資会社ミノファーマゲン製薬本館

代理人 弁理士 永田 秀男



図 1

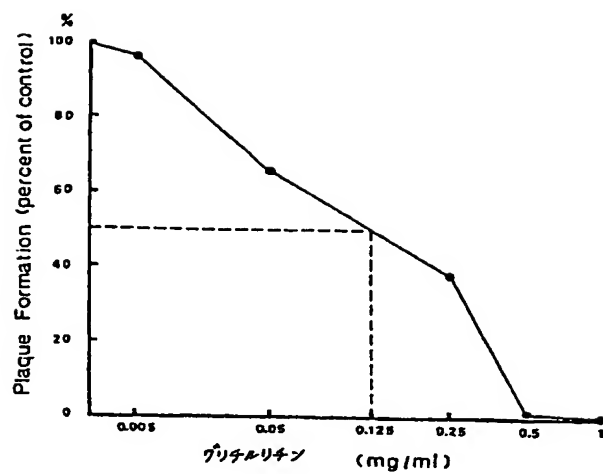


図 2

